PCT WELTORGANISATION FOR GEISTIGES EIGENTUM
INTERNATIONALE ANMELDUNG VEROFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 -

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/35121

G01N 33/00, 30/558 A1 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

(21) Internationales Aktenzeichen:

7. November 1996 (07.11.96)

(22) Internationales Anmeldedatum:

PCT/DE06/00821 3. Mai 1996 (03.05.96) (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE. CH. DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT. SE).

(30) Prioritätsdaten:

105 16 170 3

3. Mai 1995 (03.05.95) DE Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Anderungen eintreffen.

(71)(72) Anmelder und Erfinder: CAMMANN, Karl [DE/DE]: Akazienallee 1, D-48155 Münster (DF)

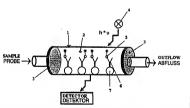
(74) Anwalt: BUTENSCHÖN-BERGMANN-REITZLE-NÖTH-GRAMBOW-KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).

(54) Title: SAMPLING DEVICE WITH INTEGRATED DOSIMETER AND FUNCTION DISPLAY AND SAMPLING PROCESS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR PROBENNAHME MIT INTEGRIERTER DOSIMETER- UND FUNKTIONSANZEIGE UND VERFAHREN ZUR PROBENNAHME

(57) Abstract

The invention relates to a sampling device and a process for the selective collection, enrichment and separation of the materials and/or biological systems (analytes) to be determined from the sample matrix concerned, which permits not only the current functional indication of the state of charge but also a quantification of the analyte on dosimeter-like principles. This is achieved by the invention by specially analyte-selective collection phases on a receptor basis, the analyte binding sites of which are, however, saturated before every use with an easily detected "indicator substance" The latter is forced out of the binding sites of the receptor by the analytes to be detected and this can



be immediately recognised by the naked eye if the indicator compounds are labelled with bright colours or fluorescence, and in other cases easily detected by means of internal or external sensors. This novel combination of a sampling device and dosimeter has considerable advantages over the prior art devices owing to the recognition of analyte ruptures which become obvious especially in trace analyses or the analysis for extremely dangerous substances.

(57) Zusammenfassung

Die Effinding richtet zich auf eine Probennahme-Vorrichtung und ein Verfahren zum selektiven Sammeln, Anzeichem und Abtrennen der zu bestimmenten Stoffe unddorfer biologischer Systeme (Analyze) von der betreffenden Probe-Mattis, das zusätzlich zu einer aktuellen Funktionsanzeige des Beladungszustandes eine Quantificienque Analyze anach dostimeterschallichen Prinzipine ermöglicht. Dies wird erfindungsgemäß durch besonden sandysetelktive Sommelphasen auf som ermeinen, deren Analyze Bindungszellen jedoch vor jedem Einsatz mit einer leich feststellbaren sog. Indikationssubstanz abgestätigt auf der ermeinen die zu bestimmenten Analyze auf den Bindungsstellen des Rezeptions verdrängt, was bei sinkt geführen oder fluorextifierenden Labebard und eine zu bestimmenten Analyze auf sinkt gestimmenten der Sommen eine Sommen eine Sommen eine Sommen der verbrängen sofort mit bloßen Augen erkennbar ist, bei anderen mittels interner oder externer Sensoren leicht feststellbar ist. Dies enteunige Kombination von Probennahmer-Vorrichtung und Dossimeter weist gegember den bäseingen Probennahmer-Vorrichtung und geste den bestieben den b

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Osterreich	GE	Georgien	NE	Niger
ΑU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neusceland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumānien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasarheten	SI	Slowenien
CH	Schweiz	u	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lenka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Sweilland
CN	China	LK	Litauen	TD	Techad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
cz	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tedschikisten
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobaro
DK	Dinemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Stanten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	υz	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		
GA	Gason	MW	Malawi		

WO 96/35121

PCT/DE96/00821

1

10

15

20

25

30

35

Vorrichtung zur Probennahme mit integrierter Dosimeter- und Funktionsanzeige und Verfahren zur Probennahme

Die Erfindung richtet sich auf eine Probenahme-Vorrichtung und ein Verfahren zum Sammeln, Anreichern
und Abtrennen der zu bestimmenden Stoffe oder komplexen biologischen und nicht-biologischen Systeme (=
Analyte) von der Probenmatrix, die auf eine neuartige
Weise gleichzeitig eine Funktionsprüfung verbunden
mit einer Quantifizierung der zu bestimmenden Substanz(en) (Analyte) ermöglicht.

Die Nachfrage nach quantitativen Analysen komplexer Stoffgemische ist in den Bereichen Umweltanalytik und in der medizinischen Diagnostik wegen eines gestiegenen Umweltbewußtseins und großen Interesses an einer raschen und zuverlässigen medizinischen Diagnostik und Vorsorge stark angestiegen. Im Bereich der Umweltanalytik, aber auch auf dem Gebiet der biologischen und medizinischen Analytik wird die Qualität einer chemischen Analyse entscheidend von der Quali-

tät der Probenahme und der Probenvorbereitung im Labor geprägt. Vor allem auf dem Gebiet der Spurenanalyse müssen die Analyte, je nach der Nachweisgrenze der jeweils verwendeten Analysenmethode, in vielen Fällen vor der eigentlichen chemisch-analytischen Bestimmung noch angereichert oder aufkonzentriert werden. Bei diesem Vorgang sollten aber die nicht zu bestimmenden (analysierenden) Bestandteile einer Probe (= Probenmatrix) nicht mit angereichert werden, da sie dann unter Umständen die eigentliche chemischanalytische Bestimmung der Analyte wegen einer nicht mehr ausreichenden Selektivität der betreffenden Bestimmungsmethode stören können. Daher ist eine einfache Aufkonzentrierung durch beispielsweises Verdampfen (Einrotieren im Rotationsverdampfer) des Lösungsmittels oder Auflösen der gesamten Gasprobe in einer kleinen Lösungsmittelmenge (im Sinne einer Gaswäsche) nicht die optimale Lösung.

Optimal ist, wenn die Anreicherung auch mit einer Abtrennung von unerwünschten Probenbestandteilen verbunden ist. Für eine chemische Analyse von gasförmigen oder flüssigen Proben haben sich daher verschiedene Probenahmstechniken bewährt.

25

30

35

10

15

20

Bei gasförmigen Proben versucht man eine Anreicherung der Analyte verbunden mit einer gleichzeitigen Abtrennung von der Hauptgasmenge dadurch zu erzielen, daß man (wie in vielen DIN-Methoden beschrieben) das Probegas durch mit einem speziellen Ab- oder Adsorptionsmittel gefüllte Sammelröhrchen leitet, daß die Analyte mit oder ohne eine chemische Veränderung (Abfangreaktion) bevorzugt zurückhält und die Probenmatrix ohne quantitative Ab- oder Adsorption oder chromatographischer Verzögerung passieren läßt. Zur

WO 96/35121 PCT/DE96/00821

eigentlichen chemischen Analyse werden die so aufkonzentrierten und mehr oder weniger von der Matrix befreiten Analytmoleküle mittels geeigneter Maßnahmen von der betreffenden Sammelphase heruntergespült, wozu für diese Eluation minimale Mengen von Gas oder Flüssigkeit Anwendung finden sollen.

Die bekannten Gas-Sammelröhrchen sind dazu, ähnlich wie im Falle einer gefüllten Chromatographie-Säule, mit einer sog. stationären Phase gefüllt, die die zu bestimmenden Stoffe (Analyte) besonders effektiv binden. Dazu werden dem derzeitigen Stand der Technik entsprechend bevorzugt Adsorptions- (Grundlage: Adsorptionsisothermen) oder Absorptionskräfte (Grundlage: Nernstscher Verteilungssatz) ausgenutzt. Beide Effekte sind leider nicht molekül- und damit analytspezifisch, sondern wirken bevorzugt über die bekannten schwachen Wechselwirkungskräfte (van der Waals, Dipol-Dipol, hydrophobe Wechselwirkungen, etc.), die z.B. durch die Polarität eines Moleküls vorgegeben sind.

Bei gasförmigen Proben verwendet man dazu vorzugsweise die bekannten stationären Phasen der Gaschromatographie, die für die Analyte ein besonders ausgeprägtes Bindungsvermögen aufweisen, während die Probenmatrix-Bestandteile nur schwach gebunden werden. Eine mehr oder weniger analyt-selektive Bindung und damit quantitative Trennung von der Matrix kommt aber leider durch diese Adsorptions- oder Absorptionskräfte (zwischen einer Gasphase und einem dünnen Flüssigkeitsfilm – analog den betreffenden Chromatographie-Arten) nicht zustande. Nach dem Stand der Technik werden in diesem Sammelröhrchen oder Behältern (Waschflaschen, Impinger oder dergl.) entweder gut

WO 96/35121 PCT/DE96/00821

4

adsorbierende Stoffe, wie Aktivkohle, Silicagel, Aluminiumoxid, Mg-Silikate (Florasil), Zeolithe, Molekularsiebe o.ä. verwendet. Die Desorption der Analyte zur nachfolgenden Analyse erfolgt dann vorzugsweise bei erhöhter Temperatur (Thermodesorption). Eluens kann ein Gas oder auch eine Flüssigkeit mit guter Löslichkeit für die Analytmoleküle sein.

Bei flüssigen Proben nutzt man bevorzugt Verteilungsgleichgewichte aus. Daher werden hier die entsprechenden typischen stationären Phasen aus der Verteilungschromatographie (vergleiche: Autorenkollektiv
(1981), Analytikum, VEB Deutscher Verlag für die
Grundstoffindustrie, Leipzig), wie z.B. Carbowax 300,
Squalan, Apizon, SE 30, SE 52, OV 17 oder auch bevorzugt das hochpolymere Tenax u.a. eingesetzt, die als
dünner Flüssigkeitsfilm auf einem inerten, gekörnten
Trägermaterial aufgezogen sind. Letzteres befindet
sich als Sammelphase in der betreffenden Sammelvorrichtung.

Die Auswahl des für den Analyten am besten geeigneten Flüssigkeitsfilm und die Wahl des geeigneten Eluationsmittels richtet sich nach dem sog. Chromatographischen Dreieck, das dem Fachmann geläufig ist. Hier wird zunächst die Auswahl der stationären Sammelphase anhand maximaler Wechselwirkungskräfte (polare Analyte benötigen polare Sammelphase, unpolare entsprechend unpolare Phasen) getroffen.

30

35

5

10

15

20

25

Bei der Probenahme von flüssigen Proben hat sich anstelle einer Extraktion mit geeigneten Lösungsmitteln, die nachher zwecks Aufkonzentrierung wieder eingeengt und entsorgt werden müssen, in den letzten Jahren die sog. Festphasen-Extraktion (Solid Phase

10

Extraction, SPE) an festen, stationären Phasen, die der Flüssig-Chromatographie entliehen sind, zur Anreicherung und Zurückhaltung der Analyte und einer Matrix-Abtrennung sehr bewährt. Bei dem entsprechenden Sammeln von Analyten aus flüssigen Proben beruht die erfolgreichste Technik der sog. Festphasen-Extraktion auf einer Verteilung eines vorzugsweise lipophilen Analyten in einer entsprechenden Phase niedriger Polarität. Besonders geeignet zum Sammeln und Auftrennen wenig polarer Analytmoleküle sind sog. beispielsweise Reversed-Phase (RP)-Füllmaterialien (z.B. RP-12 oder RP-18).

Sowohl die Probenahme von Gasen als auch die von flüssigen Proben läßt sich aber erfindungsgemäß in 15 Anlehnung an die Affinitäts-Chromatographie besonders vorteilhaft gestalten. Die Idee der vorliegenden Erfindung ist, daß man als Analyt-Sammelphase analytspezifische oder mindestens -selektive Rezeptoren (biologischer oder nichtbiologischer Art oder Her-20 kunft) verwendet. Als selektiv analyt-bindende Rezeptoren sind alle Substanzen geeignet, die analog dem Prinzip der Antigen (= Analyt) - Antikörper Wechselwirkung (Schlüssel-Schloß-Prinzip oder "Induced-Fit" 25 Handschuh-Prinzip) substanzerkennende Eigenschaften haben. Derzeit sind dazu weiter geeignet und auch bekannt: Antigen-Antikörper-Ab-Fragmente, DNA-komplimentäre DNA (Prinzip der DNA-Sonden) oder analoge Systeme auf RNA Basis, Gast-Wirtsmoleküle der sog. supramolekula-30 ren Chemie, oder stationäre Trägermaterialien, in deren Oberfläche das oder die zu sammelnden Analyt-Molekülformen nach der sog. "Molecular Imprinting Technik" eingeformt wurden, so daß dabei die jeweils zur Analyt-Molekülform komplimentäre Form dort als 35

Vertiefungen (Abdruck) auftreten.

Wegen der überaus großen Spezifität und sehr starken und selektiven Bindung von Analytmolekülen (z.B. Affinitätskonstante ca. > 10¹⁰), erlaubt die Verwendung von analytmolekül-spezifischen Rezeptoren als Sammelphase wesentlich bessere Analyt-Isolierungen und - Anreicherungen als alle anderen, bekannten Verfahren.

- 10 Bei der Sammlung aus gasförmigen Proben muß allerdings bei Verwendung biologischer Rezeptoren (Antikörper, Antikörper-Fragmente, DNA, RNA oder dergl.) eine gewissen Feuchtigkeit vorhanden sein, damit die Funktionsfähigkeit der betreffenden Proteinmoleküle 15 (Tertiär- und Quartär-Struktur) zur selektiven Analyt-Anbindung erhalten bleibt; daher ist in solchen Fällen eine Gaswäsche mit einer wässrigen oder partiell wässrigen Pufferlösung vorzuschalten. Bei flüssigen Proben braucht nur ein bestimmter pH-Wert und 20 eine bestimmte Ionenstärke eingehalten werden, damit die Proteinstruktur nicht denauturiert und damit die spezifische Analytbindungseigenschaft verloren geht.
- In allen Fällen, d.h. sowohl bei den erstgenannten

 Sammelmaterialien auf Basis der Adsorption oder Absorption (Verteilung) wie auch bei den Sammelmaterialien auf Analyt-Rezeptor-Basis ist aber der jeweils aktuelle Beladungszustand (Grad der Absättigung mit Analytmolekülen) der betreffenden Sammelvorrichtung und damit auch das sog. Analyt-Durchbruchsvolumen (verlustbringender, unkontrollierter Austritt aus der betreffenden Sammelvorrichtung wegen Überladung) der so gesammelten Probe zunächst unbekannt. Man muß zur Ermittlung dieses Probevolumens die maximal von der Sammelvorrichtung zurückgehaltene Analytmenge jeweils

WO 96/35121

für jede Sammelvorrichtung einzeln ermitteln. Dies geschieht i.d.R. empirisch aus Versuchen mit synthetischen Standards. So erhält der Fachmann analytkonzentrations-abhängige, maximale Probenvolumina, bei denen der Analyt oder die Analyte noch zu 100 % in der Sammel- und Trennvorrichtung zurückgehalten werden.

Es ist im Sinne einer richtigen Spurenanalytik von zentraler Bedeutung, daß bei der Sammlung, Anreicherung und Matrix-Abtrennung des oder der Analyte eine Wiederfindungsrate von 100 % vorliegt. Das Durchbruchsvolumen kennzeichnet jene Probenmenge (Volumen an Probengas oder -flüssigkeit), die in einer vorgegebenen Zeit durch die Sammelvorrichtung geleitet werden dürfen, bevor die ersten Analytmoleküle wieder aus der Sammelvorrichtung austreten und daher für eine spätere Quantifizierung nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies zieht Minderbefunde nach sich.

Das Durchbruchsvolumen ist aber zusätzlich auch von der Probenmatrix abhängig. Liegen mehr ähnlich gebaute Moleküle wie das Analytmolekül (oder -ion) in der Probenmatrix vor, so wird beispielsweise das Durchbruchsvolumen entscheidend verkleinert, weil die Sammelphase nur eine bestimmte, endliche Kapazität hat. Ähnlich können bei flüssigen Proben auch oberflächenaktive Substanzen in der Matrix wirken. Eine Erwärmung wirkt ebenfalls vermindernd auf das Durchbruchsvolumen. Wegen dieser starken Abhängigkeit von der individuellen Matrix der betreffenden Probe und der Sammelbedingungen, werden von erfahrenen Fachmännern i.d.R. besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen, um einen Durchbruch (= Austritt aus der Sammel-Vorrichtung noch während der Sammelphase) des oder der

10

Analyte zu verhindern bzw. auszuschließen.

Zur Verhinderung einer sog. Überladung der Sammelphase in der jeweiligen Sammelvorrichtung und damit eines Durchbruchs des oder der Analyten und damit eines Verlustes schaltet man mindestens ein zweites Gasoder Flüssigkeits-Sammelröhrchen hinter dem ersten und bestimmt auch in dieser und allen weiteren so in Serie geschalteten Sammelvorrichtungen den oder die Analyte und addiert diese Gehalte zu dem Wert, die mit dem Haupt-Sammel-System erhalten wurde.

Nach der Sammel- und Abtrennphase mit Anreicherung des oder der Analyten in der Sammelvorrichtung (Waschflaschen, Röhren, Kartuschen, Kapillaren o.ä.) 15 wird bei gasförmigen Proben entweder der oder die Analyte durch Temperaturerhöhung (Thermodesorption) oder durch eine Extraktion mit wenig Lösungsmittel aus der Sammel-Vorrichtung gebracht und eine abgemes-20 sene Menge chemisch analysiert. Bei der Festphasen-Extraktion von flüssigen Proben, wird das den Analyten am besten eluierende Lösungsmittel durch die Sammel-Vorrichtung geleitet und den oder die Analyte so der eigentlichen Analyse zugeführt. In beiden Fällen 25 ist natürlich die insgesamt durch die Sammelvorrichtung geflossene Probenmenge bekannt.

Da sowohl bei der oben erwähnten Gasprobennahme-Methode wie auch bei der für Flüssigkeiten, jegliche 30 Überladung zu fehlerhaften Analysen führt, besteht das Problem letztere zu erkennen, um sicher zu gehen. Bei stark schwankenden Analyt-Konzentrationen und variierender Matrix, Temperatur und Probe-Sammelgeschwindigkeit können selbst die Hintereinanderreihung

35 mehrerer Sammelvorrichtungen nicht mehr ausreichen,

10

Großer Nachteil der letztgenannten, bisher ausschließlich praktizierten Methode ist der entsprechend vervielfachte Arbeitsaufwand und die starke Widerstandserhöhung für den Probenfluß durch mehrere hintereinandergeschaltete Vorrichtungen. Da die eigentliche Sammelzone aus Gründen kurzer Diffusionswege der Analyte zu entsprechenden Bindungsstellen auf der Oberfläche des meist pulverförmigen Sammelmaterials relativ dicht gepackt (geschüttet) ist, wirkt diese Zone als starkes Strömungshindernis, d.h. es können sich dort, je nach Korngröße des Füll-, Träger- und Sammelmaterials, beträchtliche Druckverluste aufhauen

15 Da man aber aus Gründen des Ausschließens von Einschleppungen von Verunreinigungen die Probenahmepumpe flußmäßig stets hinter den Sammelvorrichtungen platziert (Ansaugen der Probe), können so leicht Grenzen des Probendurchsatzes erreicht werden. Eine ist beispielsweise die, daß für eine vernünftige Probenge-20 schwindigkeit ein derartig hohes Vakuum hinter der Sammelvorrichtung erzeugt werden muß, daß die betreffende Probenflüssigkeit zu sieden beginnt. Bei den proteinchemischen Sammelphasen auf Basis analyt-spe-25 zifischer biologischer Rezeptoren mit entsprechenden Analyt-Bindungsstellen kann das Problem der Protein-Denaturierung durch die verschiedensten Ursachen (Temperatur, Druck, pH-Wert, Ionenstärke, chaotrope Matrix, Schwermetalle o.a. Gifte, etc.) auftreten und 30 zum Versagen der Sammelvorrichtung führen, ohne daß andere, äußere Anzeichen darauf hindeuten. Ein denaturiertes Protein hat alle Antigen (= Analyt) -bindenden Eigenschaften verloren, d.h. es liegt eine verfügbare Sammelkapazität von Null vor. Die betref-35 fende Sammelvorrichtung ist dadurch zur Probenahme

10

ungeeignet geworden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es auch, eine verbesserte Probenahme- und Sammelvorrichtung und ein damit auszuführendes Verfahren zu schaffen, das in der Lage ist, den jeweils aktuellen Analyt-Beladungs-(-belegungs)Zustand zu erfassen und eine einfache, automatische Funktionsprüfung einer Sammelvorrichtung für gasförmige und flüssige Proben zu ermöglichen, wobei gleichzeitig im Sinne einer qualitätsteigernden Probenahmetechnik darüber hinaus damit auch noch eine vorprobenartige Analyt-Quantifizierung durchgeführt werden kann.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß 15 die betreffenden, für den oder die Analyte optimale stationäre Sammelphase nicht - wie üblich - unbelegt, also mit freien Ad- oder Absorptionsplätzen, sondern erfindungsgemäß bereits mit einer allerdings schwächer ad- oder absorbierten oder rezeptor-gebundenen 20 Verbindung (hier: Verdrängungssubstanz oder Indikationsverbindung oder -substanz genannt) belegt (gesättigt mit dieser zu verdrängenden Substanz) benutzt wird. Die von den zu sammelnden Analyten leicht zu ersetzende Verdrängungssubstanz/Indikationsverbindung 25 ist erfindungsgemäß geeignet markiert, so daß man anhand einer möglichst einfach zu erkennenden Markierungszone oder eines Integralsignals eines kleinen, nachgeschalteten, auf die durch den oder die Analyten verdrängte, markierte Substanz ansprechenden Durch-30 flußdetektors (oder interner und/oder externer Sensoren leicht feststellen kann, ob die zu sammelnden Analyte diesen Markierungsstoff bzw. diese Indikationsverbindung) schon vollständig aus dem aktiven Sammelphasenbereich der Vorrichtung verdrängt haben 35

oder nicht, was einem zu vermeidenden Durchbruch mit den bekannten Nachteilen gleich käme. Das Integralsignal stellt die Aufsummierung aller Detektor- (Sensor) signale dar und entspricht der bekannten Gesamtmenge an Indikationsverbindung, die bis zum Zeitpunkt durch die Analyte verdrängt wurde. Da die Gesamt-Kapazität der Sammelphase an Analyt-Bindungsstellen bekannt ist, läßt sich so jede restliche Sammelkapazität ermitteln.

10

15

20

5

Die durch den Analyten zu verdrängende Indikationsverbindung besteht i.d.R. aus einem analytähnlichen Bindungsmolekül mit schlechter Anbindung an die Sammelphase als das oder die Analytmoleküle, welches aber zusätzlich kovalent mit einer geeigneten Markierung versehen ist oder eine intrinsisch enthält.

Die Art der Markierung dieser Indikationssubstanz ist erfindungsgemäß unerheblich. Besonders vorteilhaft sind allerdings solche, die mit bloßen Augen und/oder minimalen Hilfsmitteln, z.B. mittels einfacher interner oder externer Sensoren feststellbar sind.

Die Auswahl der optimal geeigneten markierten Verbindung, die im Verlauf der Probenahme durch die Analytmoleküle zu verdrängen ist, erfolgt bei den chromatographischen Sammelmaterialien anhand des chromatographischen Dreiecks, indem als zu verdrängendes Molekül
eine Grundsubstanz verwendet wird, die unter den gegebenen Bedingungen kaum oder sehr schlecht auf einer
entsprechenden adsorptions- oder verteilungschromatographischen Säule zurückgehalten wird. Handelt es
sich beispielsweise bei der anzureichernden und zu
sammelnden Analytmolekülsorte um eine besonders lipophile Verbindung, die bevorzugt von einer RP-Phase

festgehalten werden, so muß die markierte Verdrängungssubstanz weniger lipophil sein, was durch einen um den Faktor > 10 unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten ausgedrückt werden kann. In diesem Fall ist die Oberfläche der Sammelphase ebenfalls lipophil (z.B. RP-18 Phase). Handelt es sich beispielsweise beim Analyten um eine hydrophile, polare Verbindung, so wird bevorzugt eine polare Sammelphasenoberfläche zur Anreicherung und Abtrennung des Analyten gewählt und eine weniger polare Markierungssubstanz zusammen mit einem ebenfalls weniger polaren Lösungsmittel verwendet.

Bei den neuartigen Sammelmaterialien auf Analyt-Rezeptor-Basis (z.B. immunchemische Bindung mittels 15 Antikörner oder analytbindende Antikörperfragmente sowie Molecular-Imprinting Technik) eignet sich erfindungsgemäß das Analyt-Molekül selbst, wenn es beispielsweise kovalent an molekülmäßig größere Markierungsatomgruppen (konjugierte Molekülgruppe mit ge-20 eigneten optischen, elektrochemischen oder anderen, zur Markierung geeigneter Eigenschaften) gebunden ist. In diesem Fall führt die sterische Hinderung des so markierten Analyt-Moleküls zu einer kleineren Affinitätskonstante, was der erfindungsgemäß beab-25 sichtigten, weniger festen Anbindung (oder Assoziation) an die Rezeptorphase entspricht.

Als geeignete Markierungsmoleküle oder -atomgruppierungen haben sich in vielen eigenen Versuchsläufen
besonders bewährt:
stabile Farbstoff-Moleküle mit besonders hohen, molekularen Extinktionskoeffizienten, fluoreszierende Moleküle mit starker Emissions-Intensität im sichtbaren
Bereich des Spektrums, Redox-Systeme auf Basis von

25

30

35

Molekülen oder Ionen mit besonders hoher Standard-Austauschstromdichte, weiterhin: elektrochemisch aktive (leicht ohne hohe Überspannung reduzier- oder oxidierbare Moleküle) sowie bestimmte Ionophore, Enzyme, massenerhöhende Gruppen, DNA/RNA-Label oder dergl., wie sie von den Immuno-Assays oder DNA-Sonden her bekannt sind.

Bei molekülmäßig zu kleinen Markierungsgruppen, die
bei kovalenter Anbindung an das Analyt-Molekül die
Affinitätskonstante zu wenig erniedrigen, so daß diese Indikationsverbindung zu schlecht von den Analyten
verdrängt wird, kann man erfindungsgemäß auch ein dem
Analytmolekül ähnliches mit einem zum betreffenden
Rezeptormolekül passenden Epitop nehmen, wenn diese
markierte Verbindung dann eine hinreichend schwächere
Bindung mit der Bindungsstelle des betreffenden Rezeptors eingeht. Hinreichend bedeutet erfindungsgemäß
eine um den Faktor mindestens 2 kleinere Affinitätskonstante.

Bei den Sammelmaterialien auf Analyt-Rezeptor-Basis ist die Art des inerten Trägermaterials für die analyterkennenden Rezeptormoleküle unerheblich. Wichtig ist nur, daß das betreffende Trägermaterial packungsmäßig in den meist säulenartigen Sammelvorrichtungen nicht zu einem zu hohen Druckverlust führt.

Erfindungsgemäß kann man die Kapazität des Sammelraumes auch durch eine Kaskadenanordnung von mit entsprechenden, analytfangenden Rezeptormolekülen beladenen Filterpapieren oder probedurchlässigen Kunststoff-Folien mit entsprechenden größeren Durchmessern erhöhen. Stand der Technik auf dem Gebiet der inerten Trägermaterialien für biologische und nicht biologi-

WO 96/35121

sche Rezeptoren sind poröse, druckstabile Träger (z.B. controlled pore glass, CPG, Kunststoff-Partikel oder solche auf anorganischer Basis, wie Silicagel o.ä.).

5

10

Wesentlich geringere Druckverluste treten in einer erfindungsgemäß mit einem aufgerollten planaren Träger (z.B. Filterpapier, Dialysierfolien, Cellophander Kunststoffmembranen) gefüllten Probesammelvorrichtung auf.

Hier können die a

Hier können die analyt-selektiven Rezeptormoleküle
auf beiden Seiten des Trägers, der durch Abstandsvorrichtungen mit definierten Zwischenräumen operiert,
immobilisiert werden. Entsprechende Anordnungen kennt
der Fachmann aus dem Gebiet der Entsalzungsanlagen
auf Basis der Umkehrosmose oder der Elektrodialyse.
Durch die dadurch gegebenen kurzen Diffusionsstrecken
der Analyt-Moleküle zu den betreffenden Bindungsstellen der Rezeptoren wird die Kinetik der Anbindung der
Analyt-Moleküle an die betreffenden Bindungsstellen
sehr beschleunigt.

Desweiteren können erfindungsgemäß als Sammelvorrichtung umfunktionierte dialysierschlauch-ähnliche Anordnungen (z.B. aus der Blutwäsche bei Nierenkranken stammend) benutzt werden, wenn die mit der Probe in Kontakt kommenden Oberflächen mit immobilisierten, analyt-bindenden Rezeptoren überzogen sind. Eine solche Anordnung kann beispielsweise weit über 100 rezeptorbeladene Schläuche mit Einzeldurchmessern unter einem Millimeter und Längen von über 10 cm enthalten. Die Probeströmung kann sowohl durch die Schläuche als auch um die Schläuche herum wie auch beim Vorliegen geeigneter Strömungs-Charakteristik beides zusammen

erfolgen. Wichtig ist eine Längsanströmung. Durch eine solche vorteilhafte Anordnung der Sammelphase wird eine große Beladungskapazität bei einem sehr geringen Druckverlust erreicht. Vorteilhafte Ausführungsformen bestehen aus durchsichtigen Materialien 5 und lassen die zur einfachen optischen Erkennung notwendigen Wellenlängen durchtreten, was ein einfaches Erkennen des Beladungszustandes mit dem bloßen Auge ermöglicht. Die jeweils andere Oberfläche der Schläu-10 che, die nicht mit der Probe in Kontakt ist, kann bei der Verwendung von Dialysierschläuchen ggfs. auch noch mit einer Lösung höherer Osmolarität gespült werden, so daß die zu sammelnden Analyt-Moleküle zusätzlich auch noch durch eine Strömung der Lösungsmittel-Moleküle in die Nähe der Bindungsstellen der 15 Rezeptoren getrieben werden. Müssen niedermolekulare Analyte von hochmolekularen getrennt werden, dann werden die analytbindenden Rezeptoren vorteilhafterweise auf jener Seite der Dialysemembran immobili-20 siert, die nicht mit der Probe in Kontakt steht, weil so bei einem richtig gewählten molekularen Cut-off hierbei eine doppelt wirkende Abtrennung erzielt wird. Diese Probenahmetechnik ist besonders zur Gewinnung von Analyten aus biologischen oder medizini-25 schen Proben geeignet.

Die richtige Orientierung der analyterkennenden Rezeptormoleküle ist die, bei der die spezifische Analyt-Bindungsstelle von der inerten Trägeroberfläche
weg zeigt, da dann eine rasche und ungehinderte Bindung des zu sammelnden Analyten eintritt und so auch eine optimale Bindungsstellen-Dichte gegeben ist.
Dazu werden in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben, die hier nicht Gegenstand der Erfindung
und dem Fachmann geläufig sind.

Die rezeptorbelegten Sammel- und Kollektorphasen für die betreffenden Analyt-Moleküle werden beim erfindungsgemäßen Verfahren vor jedem neuen Einsatz der Analyt-Sammel- und Abtrennvorrichtung mit der Indikationsverbindung abgesättigt (überschußvermeidend beladen). Der Beladungsvorgang ist entweder an der direkt oder indirekt (z.B. Bestrahlen mit Licht geeigneter Wellenlänge bei Fluoreszenzmarkern), sichtbaren Anfärbung der Sammelzone oder bei undurchsichtigen Sammelvorrichtungen und/oder anderer Markierung durch den Durchbruch dieser Indikationsverbindung in den Durchflußdetektor feststellbar. Ebenso ist detektormäßig das Auswaschen eines Überschusses verfolgbar.

Da die so markierten Indikationssubstanzen im Laufe einer Probenahme sukzessive durch die sich anders verhaltenen Analyt-Moleküle aus der betreffenden Sammelzone verdrängt werden, ergibt sich so erfindungsgemäß eine vielfache und sofortige Kontrollmöglichkeit der jeweils noch vorhandenen Beladungskapazität der Probenahme- oder -Sammelvorrichtung. Damit wird ein bestehendes Problem der Spurenanalyse komplexer Proben besonders effektiv gelöst.

Bei konstanter und reproduzierbarer Packungsdichte der aktiven Sammelzone ergibt sich erfindungsgemäß vorzugsweise bei den besonders selektiv wirkenden Sammelmaterialien auf Rezeptor-Basis durch einfaches Abmessen der durch die zu sammelnden Analyt-Moleküle veränderten Markierungszone (Strecke) nach entsprechender Kalibrierung zusätzlich auch noch ein quantitativer Hinweis, der als Vorprobe dienen kann. Dieses Dosimeter-Verfahren kann darüber hinaus auch vorteilhaft zur Ermittlung der für die nachfolgende analytische Bestimmung optimaler Analytkonzentration her-

angezogen werden, was überflüssige, zusätzliche Bestimmungen erspart. Gleichzeitig wird durch die dadurch gegebene Redundanz der Ergebnisse die Zuverlässigkeit der betreffenden Analyse gesteigert.

5

10

15

35

Bei der erfindungsgemäß möglichen Verwendung von geeigneten Rezeptoren, die selektiv bestimmte Substanzklassen binden, ergibt sich darüber hinaus mittels
einer derartigen neuen Sammelvorrichtung eine neue
und besonders einfache und schnelle Methode zur zuverlässigen Bestimmung einer Vielzahl von entsprechenden Summenparametern. Es versteht sich für
einen Fachmann von selbst, daß eine solche Sammelvorrichtung, die erfindungsgemäß mit einer auch als Dosimeter dienenden, Zustandsanzeige kombiniert ist, in
den verschiedensten Einheiten, wie beispielsweise
Masse oder Molarität kalibrierbar ist.

- Die vorliegende Erfindung vereinigt dadurch die be20 kannten Techniken der Analyt-Anreicherung und Matrixabtrennung bei gasförmigen und flüssigen Proben mit
 einer neuen Technik der quantitativen PrüfröhrchenAnalyse auf Analyt-Rezeptor-Basis.
- 25 Im Fall eines Sammelmechanismusses auf chromatographischer Basis wird, nach dem derzeitigen Stand der Technik zu urteilen, keine Indikationssubstanz zur on-line Sichtkontrolle der Funktionsweise verwendet, die auch quantitative Abschätzungen der Analytkonzentration ermöglichen würde. Alle bisher in der Literatur beschriebenen Probesammelvorrichtungen schlagen die Hintereinanderschaltung derartiger Vorrichtungen zur Vermeidung von Analytverlusten vor. Ähnlich äußern sich auch alle standardisierten Verfahren (z.B.

DIN-, EPA- u.a. Vorschriften).

10

15

20

Der Stand der Technik auf dem Gebiet der Prüfröhrchen oder Dosimeter ist bisher dadurch charakterisiert, daß mehr oder weniger selektive chemische Reaktionen des Analyten mit bestimmten Reagenzien ablaufen, die aber i.d.R. zu einer irreversiblen Veränderung des Analyten führen. Dadurch sind derartige Vorrichtungen zur Probenahme, Probenanreicherung und Abtrennung von Analyten weniger geeignet. Dosimeter auf dieser Grundlage sind seit langem im Einsatz und lassen sich i.d.R. nicht für weitere Messungen regenerieren.

Im Fall der erfindungsgemäßen Probenahmevorrichtung auf Analyt-Rezeptor-Basis, werden die Analyt-Moleküle unverändert und reversibel an die Rezeptormoleküle gebunden oder assoziiert. Sie können danach durch bekannte, das Rezeptormolekül schonende Verfahren (pH-Wert Veränderung, chaotrope Reagenzien) wieder unverändert abgespalten und einer chemischen Analyse zugeführt werden. Charakteristisch für die vorliegende Erfindung ist daher auch die Reversibilität der Sammel-, Anreicherungs- und Abtrennmechanismen sowie die der Regenerierbarkeit der dadurch gegebenen Dosimeter.

Bekannt sind direkte on-line immunochemische Monitore
auf der Grundlage der Verdrängung eines schwächer
gebundenen fluoreszenz-markierten Antigens von einer
affinitätschromatographischen Säule in Form einer
entsprechenden Kartusche. Hier dient aber die Registrierung der aus der Kartusche austretenden fluoreszierenden Verbindung als direktes Analysensignal (Bestimmungssignal). In keinem Fall erfolgt die Quantifizierung durch das Abmessen einer Strecke der Sammelphase. Das optische Detektorsignal geht bei den
dem Fachmann bekannten Assay-Verfahren bei Erschöp-

10

15

20

fung des "Immuno-Reaktors" gegen Null, was schwer von dem Zustand bei geringen Analytspuren zu unterscheiden ist. Demgegenüber bleibt in einem solchen Fall bei der vorliegenden Erfindung die markierte Zone in der Sammelvorrichtung nahezu unverändert. Es ist aber trotzdem noch der aktuelle Beladungszustand sofort ablesbar.

Bekannt sind auch weitere direkte Bestimmungstechniken in miniaturisierter Kit-Form, bei denen ein markiertes Reagenz-Antigen nach entsprechender Verdrängung durch das Analyt-Antigen in einen eng benachbarten Reaktionsraum eindiffundiert und dort beispielsweise mit Hilfe zusätzlicher Reagenzien eine empfindliche Chemolumineszenz erzeugt, die direkt gemessen
wird. Diese und alle weiteren Verfahren zur direkten
Anzeige und Quantifizierung niedermolekularer Moleküle stellen direkte Bestimmungsverfahren auf immunochemischer Basis (Immunoassays) und keine Probennahmetechniken, bzw. keine Kombination von Probenahmemit Dosimetertschnik dar

Die vorliegende Erfindung stellt in erster Linie eine optimierte und besonders vorteilhafte Probenvorberei-25 tungstechnik dar, die die Sammlung der interessierenden Analyten mit ihrer Anreicherung und Abtrennung von der Probenmatrix verbindet und die die eigentliche hochgenaue Bestimmung des oder der Analyte mittels beliebiger Methoden gestattet. Dabei ist erfin-30 dungsgemäß die Art der Analyt-Anbindung durch sehr selektive immunochemische Bindungen oder mehr physikalisch-chemischer Adsorption oder Verteilung unerheblich. Wichtig ist erfindungsgemäß die Einfachheit der Markierung und ihre Feststellung und damit die 35 zuverlässige Anzeige der jeweils (noch) vorhandenen

Analyt-Sammelkapazität, die in vielen Fällen auch noch gleichzeitig als Dosimeter dienen kann.

Wegen der großen Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten von stationären Sammelphasen mit den unterschiedlichsten strömenden Phasen ermöglicht die Erfindung eine nicht naheliegende Erweiterung aller bisher beschriebenen Immuno-Assay Techniken. Die Erfindung betrifft daher eine ideale Kombination von Probenahmetechniken mit Anreicherungs- und Abtrenntechniken, wobei je nach der vorher gewählten Selektivität der Sammelphase, nur ein einziger Analyt oder auch eine bestimmte Stoffklasse (Summenparameter-Bestimmung) gesammelt werden kann.

15

10

Die quantitative Gewinnung des so automatisch angereicherten und von der oft störenden Probenmatrix abgetrennten Analyten geschieht nach den bekannten Festphasenextraktionsmethoden, wobei die optische 20 Verfolgung des Auswaschens des Restes der Indikationsverbindung die Extraktionseffektivität zu kontrollieren erlaubt; wenn sie nicht extrahiert wird. dann werden die gesammelten Analytmoleküle es erst recht nicht. Bei immunochemischen Methoden (affini-25 tätskontrollierte Sammlung von einer Analytmolekülsorte oder mehrere Sorten) werden die bekannten Techniken der schonenden Antikörper-Antigen-Dissoziation, wie beispielsweise die Eluation mittels chaotroper Reagenzien (z.B. Harnstoff u.a.) oder einer sauren Pufferlösung (pH zwischen 1 bis 3) dazu verwendet. 30 Die Menge an Eluationsmittel ist so bemessen, daß die Sammelphase dabei auch von der markierten Verbindung befreit wird.

35 Umfangreiche Tests im Vorfeld der Erfindung haben

ergeben, daß gut (richtige Orientierung) immobilisierte Affinitätsphasen viele dieser Regenerationsschritte ohne wesentliche Einbuße an Funktionsfähigkeit überstehen. Sie können durch erneute Beladung unter optimalen Bindebedingungen (pH-Wert, Ionenstärke etc.) mit dem markierten, zu verdrängenden Antigen wieder beladen werden und zur nächsten Probenahme verwendet werden. Auch bei dieser Beladung mit der Indikationsverbindung (markierten Antigen) ist eine leicht sichtbare Markierung von besonderem Vorteil, denn man erkennt sofort den Beladungszustand und damit den Zeitpunkt, wenn keine überschüssige Markierungssubstanz beim Spülvorgang mehr aus der Sammelzone austritt.

15

20

10

5

Durch die freie Wahl einer optimalen Analysemethode für den erfindungsgemäß abgetrennten und angereicherten Analyten, ergeben sich bezüglich der entscheidenden Analysen- und Bestimmungsmethode besonders vorteilhafte Freiheitsgrade, die zusätzlich wegen der Abtrennung störender Beimengungen zu besonders zuverlässigen und richtigen Analysenbefunden führen.

25

Ein Einsatz dieser selbstkontrollierenden Analyt-Sammel-Vorrichtung verbessert dadurch die Nachweisgrenzen und Richtigkeit von Spurenanalysen in gasförmigen
und flüssigen Proben bei gleichzeitiger Vereinfachung
und Zeitersparnis. Die Erfindung stellt dadurch eine
entscheidende Weiterentwicklung alle bekannten, auf
eine Verdrängungsreaktion basierender Bio- oder Immuno-Assays dar, die demgegenüber keinerlei Bestimmungsmethodenfreiheit aufweisen.

35

30

Dementsprechend löst die Erfindung mehrere Probleme

der Spurenanalyse von gasförmigen und flüssigen Proben, die durch die bekannte Immuno-Assays und Prüfrohrtechniken allein nicht gelöst werden.

- Mit der vorliegenden Erfindung werden die folgenden, besonders für die Spurenanalyse extrem bedeutsamen Vorteile erreicht:
 - a) Der aktuelle Beladungszustand der betreffenden Sammelvorrichtung kann sofort erkannt werden, d.h. neu und frisch kann von dem Zustand alt, gebraucht oder noch analyt-beladen oder mit anderen Stoffen abgesättigt, auf Anhieb unterschieden werden.
- b) Es ist erkennbar, ob in der Probematrix der zu
 analysierende Stoff überhaupt in nennenswerten
 Mengen vorhanden ist; denn wenn die Markierungszone sich nicht während des Durchleitens der
 Probe verändert, ist nichts vorhanden, was später zu analysieren wäre, was Analysenzeit, -kosten und Chemikalien-Abfall spart. Außerdem kann
 dadurch nahezu automatisch und in-situ und ohne
 Vorinformation über zu erwartende Analytkonzentrationen eine optimale Probenmenge gezogen werden.
- 25 c) Nach einer geeigneten Kalibrierung kann aus dem Abschnitt, bei dem die Indikationssubstanz durch den Analyten verdrängt wurde, die bis dahin gesammelte Menge ermittelt werden (Prüfröhrchen-Prinzip).
- 30 d) Es ist sofort feststellbar, wenn die Kapazität einer Probenahme-Vorrichtung dem Ende zugeht oder bereits überschritten wurde, was Analysenfehler verhindert.
- e) Es werden keine weiteren Probenahmevorrichtungen 35 in Serie benötigt, um das Durchbrennen zu ver-

20

- hindern, was den Druckverlust in Grenzen hält und Arbeitszeit für die gesonderte Aufarbeitung erspart.
- f) Die Sammel- und Abtrennvorrichtungen sind weiter miniaturisierbar und benötigen aus Sicherheitsgründen nicht eine so lange Durchfluß-Strecke der Sammelphase, sondern können wegen der Kontrollmöglichkeit mit vergrößerten, durchströmten Flächen arbeiten, was zu einem geringeren Druckverlust führt und weniger Pumpleistung erfordert.
 - g) Bei der Gewinnung der so gesammlten Analyten durch Eluation der so gleichzeitig von der Probenmatrix abgetrennten Analyte ist die Menge an Eluationsmittel, die zur verlustlosen Auswaschung der gesamten, gesammelten Analytmenge notwendig ist, diejenige, die auch die noch vorliegende Menge der markierten Verbindung aus der Probenahmevorrichtung verdrängt. Dies verhindert eine überflüssige Verdünnung.
 - h) Die Abmessungen der Sammelvorrichtung und damit auch ihre gesamte Sammelkapazität kann der nachfolgenden analytischen Bestimmungsmethode genau angepaßt werden, d.h., wenn durch das Verschwinden der markierten Sammelzone eine für die nachfolgende Bestimmung optimale Probemenge gesammelt wurde, kann der Sammelvorgang abgebrochen werden und die genaue Analytbestimmung beginnen.
- i) Durch die analytkonzentrationsabhängige Probe-30 nahmezeit werden unnütze Sammelzeiten, die evtl. zu zu hohen Analytanreicherungen führen und wieder einen zusätzlichen Verdünnungsschritt vor der Bestimmung erfordern, vermieden.
- j) Bei einer stöchiometrisch konstanten Verdrängung
 von leichter gebundenen, entsprechend markierten

Rezeptor-Partnern kann bei gefährlichen Analyten (z.B. Toxinen, Viren, Bakterien oder dergl.) auf eine zu starke Anreicherung und anschließende Eluation verzichtet werden, wenn die Markierung ein DNA/RNA-Label darstellt, das mit der bekannten PCR-Technik extrem empfindlich bestimmbar ist.

5

10

Ausführungsbeispiele der Erfindung werden in den Figuren 1 bis 7 erläutert.

In Fig. 1 ist eine besonders vorteilhafte, weil einfache optische Version der Erfindung schematisch dargestellt. Dazu ist ein Glas- oder Quarzrohr (UV-

- durchlässig) 1 mit der betreffenden analyt-optimierten Sammelphase 2 mit einem inerten Material 7, Rezeptoren 6 und Indikationssubstanz 5 unter Verwendung
 von zwei Fixierungselementen aus Glas- oder Quarzwolle oder entsprechenden Fritten 3 gefüllt. Bei Verwendung intensiv gefärbter geeigneter Indikationsstoffe
- cum intensiv gerarbter geeigneter Indikationsstoffe
 oder Antigen-Konjugaten mit besonders großen molekularen Extinktionskoeffizienten (wie z.B. Phorphyrine,
 Carotinoide, Kristallviolett, etc.) kann anhand der
 entfärbten Zone in der Vorrichtung die jeweils noch
 aktuell vorhandene Sammelkapazität sofort abgelesen
- aktuell vornandene Sammelkapazität sofort abgelesen werden. Nach entsprechender Kalibration ist dadurch auch die Dosis zusätzlich errechenbar.
- Farbige, durch die Analytmoleküle zu verdrängende
 Antigene erhält man aus dem Analytmolekül selbst,
 indem es chemisch mit bekannten, stabilen und intensiv gefärbten Farbstoffen oder chromophoren Gruppen
 kovalent verbunden wird. Es können aber auch dem Analyten ähnliche Moleküle mit eindeutig schwächerer
 Affinität zur Anreicherungsphase dazu verwendet wer-

den. Bei einer nicht immunochemischen Analytbindung kann durch eine geeignete Wahl der chemischen Eigenschaft der chromophoren oder fluorophoren Gruppe die Lipophilie des Markierungsmoleküls (Indikationssubstanz) eingestellt werden.

Aus Gründen der Empfindlichkeit sind alle bekannten, stabilen Fluoreszenzmarkierungen aus der Immuno-Assay oder Immuno-Sensor-Technik hier besonders gut geeignet. Die genaue Art spielt hier keine Rolle. Hierzu muß dann das Probenahmeröhrchen 1 mit der betreffenden, bekannten Anregungswellenlänge über eine Strahlungsquelle 4 beleuchtet werden. Vorteilhaft ist hier eine Fluoreszenz im sichtbaren Bereich des Lichtes, da dann die analyt-beladene, nicht-fluoreszierende Zone leicht und einfach zu erkennen ist.

Fig. 2 zeigt ein Ausführungsbeispiel mittels einer Detektoranzeige 8, die erfindungsgemäß dann angewandt 20 werden kann, wenn die Probensammelvorrichtung für Licht undurchlässig ist oder wenn eine elektrochemische Markierung, wie beispielsweise Ferrocen, oder Moleküle mit einer chinoiden Struktur oder mit anderen gut zu reduzierenden oder oxidierenden Gruppen 25 bzw. anderer Sensor-Markierung an das Analytmolekül gekoppelt ist. Hier ist zur Anzeige des Beladungszustandes und damit der Funktionsweise entweder an den inneren Gefäßwandungen des Sammelröhrchens ein die gesamte Sammelphase überstreichendes Elektrodenarrav 30 oder ein zusätzlicher externer Durchflußdetektor 8 erforderlich. Alternativ kann selbstverständlich an dieser Stelle auch ein entsprechender optischer Durchflußdetektor zur integralen Erfassung der verdrängten Markermoleküle verwendet werden.

5

10

Fig. 3 zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel mit einer weiteren Markierungsart. So können beispielsweise auch Enzyme als Marker für die zu verdrängenden Analytmolekül-Konjugat-Verbindung eingesetzt werden. Hier muß allerdings vor dem Detektor über eine Zugabevorrichtung 9 ein entsprechendes Substrat, welches von der verdrängten enzymmarkierten Verbindung in ein detektionsfähiges Produkt umgewandelt wird. zugeführt werden. Besonders geeignet, da bereits wegen ihrer Verwendung bei entsprechenden Immuno-Assavs 10 kommerziell vorhanden, sind Analytmarkierungen mit beispielsweise Glucoseoxidase (GOD) oder alkalische Peroxidase (POD) oder Phosphatase, bei denen in Gegenwart dieser Enzyme (verdrängt von der Anreicherungs- und Sammelzone) aus den zuzusetzenden Substraten Glucose, resp. Wasserstoffperoxid, resp. p-Aminobenzoylphosphat, elektrochemisch sehr gut anzuzeigende Verbindungen entstehen, die dem Durchschnittsfachmann geläufig sind.

20

15

Fig. 4 zeigt ein schematisiertes Ausführungsbeispiel für eine optimale in-situ Probenvorbereitung bei gasförmigen und flüssigen Proben. Bei gasförmigen Proben wird das zu untersuchende Gas vor dem Aufgeben auf die Sammelvorrichtung mittels eines sog. Scrubbers 10 25 (Gaswäscher) von den Analyten quantitativ befreit und letzterer in eine flüssige Phase überführt. Diese flüssige Phase kann aus einer wäßrigen Pufferlösung, aber auch - je nach Stabilität der Rezeptormoleküle -30 auch aus einem organischen Lösungsmittel bestehen. Die die Analyte enthaltenden Flüssigkeiten werden dann durch die Sammelvorrichtung geleitet, wo eine Abtrennung und selektive Anreicherung der Analyte erfolgt.

Bei flüssigen Proben wird vorteilhafterweise dem Probenstrom durch eine immunochemische Sammelvorrichtung auch noch eine kleine Menge einer Pufferlösung mit hoher Pufferkapazität zugemischt. Der pH-Wert soll dem, bei dem eine optimale Anbindung des Analyten an die betreffende Bindungsstelle stattfindet, entsprechen.

- Fig. 5 zeigt ein Vorrichtungsbeispiel mit kaskaden-10 artiger Anordnung der Sammelphasenträger, die auch zur gleichzeitigen Sammlung mehrerer Analyte eine unterschiedliche Selektivität haben können.
- Fig. 6 zeigt ein weiteres Beispiel einer Sammelvor-15 richtung auf Basis der Dialyseschlauch-Anordnung mit parallelen Einzelschläuchen, was zu hohen Beladungskapazitäten führt.
- Fig. 7 zeigt einen biologischen Anwendungsfall, bei dem der oder die Analyte so gefährlich sind, daß nur 20 minimale Mengen davon gesammelt werden und jene auch in einer vor eine Spritze 11 aufzusetzenden Kartusche 12 mit selektiver Sammelphase verbleiben. Hier wird durch Ansaugen über die Nadel 13 die Probe über diese 25 rezeptorbeladene Phase geleitet, wodurch dann eine äquivalente Menge der harmlosen Indikationssubstanz 14 beim Zurückschieben des Spritzenkolbens für eine weitergehende Analyse freigesetzt wird. Besonders vorteilhaft ist in solchen Fällen eine Markierung 30 mittels DNA/RNA-Labeln, da dann die PCR-Technik zur Analyse dieser Spuren eingesetzt werden kann.

5 Patentansprüche

- Vorrichtung zur Probenahme bei gasförmigen und 1. flüssigen Proben zum Zwecke einer selektiven Anreicherung und Matrixabtrennung von zu bestim-10 menden Stoffen und/oder biologischen Systemen (Analyten) mit integrierter Dosimeter-Anzeige als Funktionsanzeige. gekennzeichnet; dadurch 15 daß der jeweils aktuelle Beladungszustand von analyt- und/oder stoffgruppen- oder biosystemselektiven Sammelphasen mittels Markierung durch eine Indikationssubstanz feststellbar ist, in dem in der Verbindung die Verdrängung der Indikationssubstanz aus spezifischen Bindungsstellen 20 der Sammelphasen durch die zu sammelnden Stoffe/Biosysteme als Dosimeter und zu ihrer Funktionsüberprüfung einsetzbar ist.
- Vorrichtung nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeich net,
 daß in der markierten Sammelzone der Vorrichtung
 geometrische Formen verwirklicht sind, die eine
 Quantifizierung über eine Streckenskala oder ein
 Abzählen von von Indikationssubstanz-freien Zonen der Sammelböden (ohne Markierung) ermöglichen.

- Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, з. dadurch gekennzeichnet, daß die analyt-selektiven und markierten Sammelphasen auf inerte Träger immobilisiert sind, die als körniges Schüttgut mit mittleren Durchmes-5 sern im Mikrometermaßstab in lichtdurchlässigen. röhren- oder schlauchförmigen oder rechteckigen Durchström-Anordnungen einen minimalen Druckverlust ergeben und daß die durch Verdrängung der Indikationssubstanz durch Analytmoleküle ent-10 standene markierungsfreie Zone, die gut sichtbar ist, eine schnelle und einfache, mit dem bloßen Auge feststellbare Quantifizierung ermöglicht.
- 15 4. Vorrichtung nach Anspruch 3. gekennzeichnet, dadurch daß die inerten Träger für die analyt-selektiven und markierten Sammelphasen durchlässige und undurchlässige Folien sind, die entweder kaskadenartig mit großem Querschnitt hintereinander 20 geschaltet senkrecht zu ihrer Oberfläche von der Probe durchströmt werden oder die parallel zur Oberfläche in einer aufgerollten Form, mit definierten Abstandshaltern versehen, mit der Probe beaufschlagt werden, wobei eine oder beide Trä-25 ger-Oberflächen mit der Sammelphase belegt sind.
- 5. Vorrichtung nach Anspruch 4, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß bei kaskadenförmiger Anordnung der inerten Träger, diese verschiedene, unterschiedliche Analyte bindende Sammel-materialien enthalten und dadurch eine Multi-Dosimeter-Anordnung ausgebildet ist.

- 6. Vorrichtung nach Anspruch 3, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die inerten Träger einzeln oder gebündelt angeordnete, schlauch- oder röhrenförmige Membranen oder Kapillaren sind, wobei die Druchströmung mit der Probe beidseitig simultan oder sequentiell, d.h. erst außen vorbei und danach innen durch die Schläuche, Röhren, Kapillaren oder umgekehrt, erfolgt.
- 10 7. Vorrichtung nach Anspruch 6. dadurch gekennzeichnet, daß die schlauchförmigen Membranen Dialysier-Anordnungen aus dem medizinischen Bereich sind, 15 die Sammelphasen nach den Methoden der gerichteten kovalenten Anbindung auf die Oberflächen der Dialvsierschläuche immobilisiert sind und daß durch einen zusätzlichen osmotischen Gradienten über der Dialysiermembran ein gesteigerter Lö-20 sungsmittelfluß senkrecht zur Membranoberfläche erzeugbar ist, der die Analyt-Anbindungskinetik unterstützt.
- 8. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 3,

 25 dadurch gekennzeichnet,
 daß die markierten und selektiv analyt-bindenden
 Sammelphasen entweder den zu bestimmenden Stoff
 selektiv binden oder eine zu bestimmende Stoffklasse bzw. das zu sammelnde biologische System

 30 selektiv durch Bindung aus dem Probenstromquantitativ entfernen.
- 9. Vorrichtung nach Anspruch 3 oder 6,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 daß als markierte analyt-bindende Sammelphase

10.

den zu sammelnden Stoffen entsprechende selektiv wirkende Rezeptoren in einer molekularen Orientierung mit zugänglichen Bindungsstellen auf den Trägeroberflächen immobilisiert sind.

5

10

15

. 20

- Vorrichtung nach Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die selektiv analyt-bindende Rezeptoren folgende Molekül-Klassen oder Mischungen von verschiedenen, zu einer Klasse gehörigen oder verschiedenen Klassen angehörenden Rezeptoren umfassen:
 - a) immunologische Antikörper oder Antikörper-Fragmente mit den zu sammelnden Stoffen oder Biosystemen als Antigen;
- komplimentäre DNA/RNA zu der, die es isoliert oder gebunden zu sammeln gilt (DNA-Sonden-Prinzip);
- c) supra-molekulare Wirts-Gast-Verbindungen;
- d) durch "Molecular-Imprinting"-Technik gewonnene, selektiv die komplimentäre Analyt-Molekülform-erkennende Oberflächen;
- e) stationäre Phasen der Chromatographie; wobei bei den Molekül-Klassen a) bis c) ein nicht auf der Trägeroberfläche immobilisierter Partner aus den Proben gesammelt wird.
- 11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 und 10,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 daß die Rezeptoren mit einer schwächer als der
 Analyt gebundenen (assoziierten) und leicht direkt optisch (mit bloßem Auge) oder mittels einfacher interner oder externer Sensoren anzeigbaren Indikationssubstanz als Markerverbindung
 35 abgesättigt sind.

10

- 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Indikationssubstanz ein dem oder der Analytenstruktur formelmäßig oder physikalischchemisch ähnliches Molekül enthält, das die Eigenschaft hat, von den zu sammelnden Stoffen leicht aus der spezifischen Bindung und Assoziation mit dem Rezeptor verdrängt zu werden und direkt optisch oder indirekt mittels interner oder externer Sensoren feststellbar ist.
- 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Indikationssubstanz das Analytmolekül oder die zu sammelnden Stoffe oder biochemischen Systeme selbst, modifiziert durch eine Marker-Atomgruppierung, enhält.
- 14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
 20 dadurch gekennzeichnet,
 daß sie einen Durchflußdetektor aufweist, der
 über das Integral des Durchfluß-Signals von der
 markierten, von den Analyten verdrängten Indikationssubstanz den aktuellen Zustand der Sammelvorrichtung anzeigt und eine Summendosis angibt.
- 15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 daß die Quantifizierung der durch die zu sammelnden Stoffe verdrängten Indikationssubstanzen
 mittels interner oder externer Sensoren auf optischer, massensensitiver, kalorimetrischen oder
 elektrochemischen Basis erfolgt.

- 16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß sie ein zur Probenströmung paralleles lineares Sensor-Array enthält, das auf einem angeschlossenen Rechner eine Zustands-Anzeige (Belegungsgrad) und Dosis-Quantifizierung ermöglicht.
- Verfahren zur Probenahme bei gasförmigen und 17. flüssigen Proben zum Zwecke einer Selektion An-10 reicherung und Matrixabtrennung mindestens eines Analysen kombiniert mit einer dosimeter-ähnlichen Ouantifizierung. dadurch gekennzeichnet, daß analyt- und/oder stoffgruppen- oder biosystem-selektive Sammelphasen vor jeder Probenahme 15 mit mindestens einer stabilen und leicht feststellbaren Indikationssubstanz beladen werden. die während eines Sammelvorgangs von den zu sammelnden Stoffen/Biosystemen von der Oberfläche der Sammelphase verdrängt wird, wobei sich die 20 Analyt-Dosis aus der Menge der analyt-verdrängten Indikationssubstanz (markierungsfreie Zone) ergibt, die durch eine Streckenmessung oder mittels eines integrierten Detektorsignals erfaßt wird. 25
- 18. Verfahren nach Anspruch 17,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 daß die Analyte mittels eines Eluationsmittels
 aus der Probenahme-Vorrichtung entfernt und einer weiteren chemischen Analyse zugeführt werden.

WO 96/35121

- 19. Verfahren nach Anspruch 17,
 da durch gekennzeichnet,
 daß bei gefährlichen (toxischen) Analyten auf
 eine zu große Anreicherung verzichtet wird, wozu
 als zu verdrängende Indikationssubstanzein
 schwächer gebundener Partner des betreffenden
 Rezeptors, der mit einem DNA/RNA-Label versehen
 ist, gewählt wird und die vom Analyten freigesetzte äquivalente Menge der so markierten Indikationssubstanz mittels extrem empfindlichen
 PCR-Technik gemessen wird.
- 20. Verfahren nach Anspruch 17, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß Hilfsreagenzien zur Feststellung des Ausmaßes der Markierungsverdrängung in den Probenoder Flüssigkeitsstrom eingespeist werden.
- 20 21. Verfahren nach den Ansprüchen 19 oder 20,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 daß die Vorrichtung in Form einer rezeptorgefüllten Kartusche an einer medizinischen Nadel
 oder Spritze positioniert wird und nach dem Ansaugen eines bestimmten Probevolumens die vor
 dem darin enthaltenen Analyten verdrängten DNA/RNA-gelabelten Indikationssubstanz-Moleküle in
 einen anderen Behälter zur weiteren PCR-basierenden Ouantifizierung übersbült werden.

FIG. 1

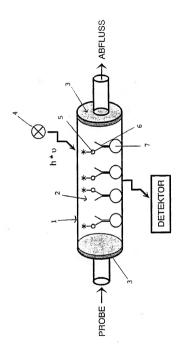


FIG. 2

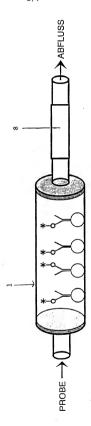


FIG. 3

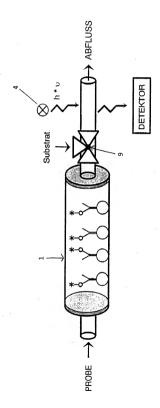


FIG. 4

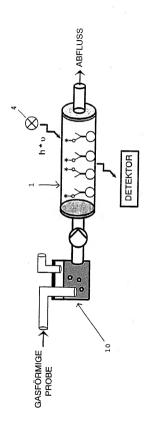
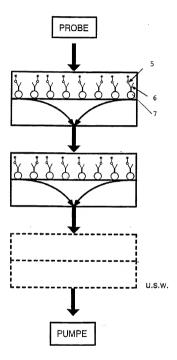
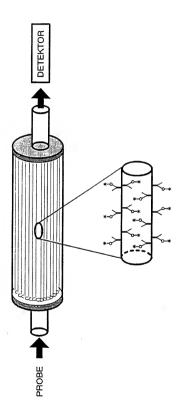


FIG. 5



PCT/DE96/00821

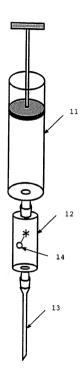
FIG. 6



WO 96/35121 PCT/DE96/00821

7/7

FIG. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No PCT/DE 96/00821

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT	MATTER GO1N33/558	

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
х	US 4 425 438 A (D. BAUMANN) 10 January 1984	1-3,8, 10-12, 14,15, 17,20
	see column 13, line 59-68	
A	DE 27 20 073 A (RIEDEL-DE-HAAN) 9 November 1978 see page 3, paragraph 3 see page 4, paragraph 2 see page 7, paragraph 2-4 see page 8, paragraph 3-6	1-3,8, 12,17
	see page 10, paragraph 1	:
A	DE 26 09 869 A (KURT DANNHÄUSER) 15 September 1977 see page 4 - page 6, paragraph 1	1
	-/	

X Future documents are listed in the continuation of box C. X Patent family members are listed in names. * Special categories of cited documents: **A document defining the general state of the art which is not considered to be for particular refevenance of the state of the international filling date. **L** document which may throw doubt on er after the international filling date or which a state of pecial reason fits specified) **O** document which may throw doubt on priority datain() or which as their operation reason for the confidered novel or canned be considered of which as the condition of the condition of the state alone of the special reason for the condition of the condition of the international filling date but later than the periority data claims, exhibition or other means. **D** document international reason for the international filling date but later than the periority data claims, exhibition or other means. **D** document international reason for the international filling date but later than the periority data claims of the condition of the international filling date or priority data claims for the comment of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be conditioned to common the conditional or invention cannot be conditioned to expect when the document is determined the conditioned to invention at invention cannot be conditioned to invention at invention cannot be conditioned to invention at invention cannot be conditioned to obtain the conditional date or priority data claims of priority data claims of the business and not in consider which the applications but into document of particular relevance, the claimed international date or priority data claims of pri		·
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular retrease." The surfice of the considered to be of particular retrease. The surfice of the considered to be of particular retrease. The surfice of the considered to be of particular retrease. The surfice of the considered to be on priority data-flat on early which is state to entablish the politication dute of enoting the surfice of enoting the politications, use, exhibition or observable to entablish the politications, use, exhibition or "P" document published prior to be international filing date but later than the priority data-flation. The surfice of the serial completion of the international filing date but later than the priority data-flation and the priority data-flation or all the internation of the international states alone document published prior to exhibit the published or "P" document published prior to be international filing date but later than the priority data-flation or all the international dependence of the second territory to consider the priority data-flation in the priority data-flation or all the priority data-flation in the priority data-flation or all the priority data-flation in the priority data-flation or all the priority data-flation in the priority data-flation or all the priority data-flation in the priority data-flation or all the priority data-flation in the priority data-flation or all the priority data-flation in the priority data-flation or priority data-flation in the priority data-flation in	Further documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed in annex.
26 September 1996 Name and mailing address of the EA BUYUNGEN PRANTO (Office, P.B. 5818 Paterniaan 2 N.L	'A' document defining the peneral state of fee art which is not "E' state document but published on or after the international diling date." L' document which may throw doubt on priority dainef() or which is called to entain the published one of another or document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other measure. P' document published prior to the international filing date but tater than the priority date claims.	or priority date and not in conflict with the application but indeed to understand the principle or theory understand the conflict of
Talle and intenting and use to the low the proper plant Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2220 HV Rijsmijk Td. (+31-70) 462-040, Tx. 31 651 epo nl, 7 inngrebe. U	·	
122 (1314) 345 345	European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk	

Form PCT/ISA/210 (second short) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No PCT/DE 96/00821

C.(Continua	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Α	EP 0 202 423 A (DRAEGERWERK AG) 26 November 1986 see column 3, line 32 - column 4, line 40	1-3
A	EP 0 520 202 A (DRÄGERWERKE AG) 30 December 1992 see page 2, column 42 - page 4, column 10	1
A	EP 0 560 411 A (UNILEVER NV) 15 September 1993 see page 8, line 10-43	1
A	EP 0 648 532 A (ENGELHARD PROCESS CHEMICALS) 19 April 1995 see page 3, line 47-49	1
	* • • • •	
		46
	-97	*

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. ional Application No PCT/DE 96/00821

			101/00	96/00821	
Patent document cited in search report	Publication date		family ber(s)	Publication date	
US-A-4425438	10-01-84	AU-B- AU-A- CA-A- EP-A- JP-C-	560649 8135482 1184114 0060700 1778223	16-04-87 16-09-82 19-03-85 22-09-82 28-07-93	
		JP-B- JP-A-	4059586 57161647	22-09-92 05-10-82	
DE-A-2720073	09-11-78	NONE	1	- 1	
DE-A-2609869	15-09-77	NONE			
EP-A-202423	26-11-86	DE-U- JP-A-	8510497 61235751	05-06-85 21-10-86	
EP-A-520202	30-12-92	DE-A-	4121493	07-01-93	
EP-A-560411	15-09-93	AU-B- AU-A- AU-A- DE-D- DE-T- DE-U- EP-A- ES-T- FR-A- WO-A- GB-A- HK-A- JP-A-	626207 1622888 8048994 8049994 3887771 3887771 8805565 0291194 0560410 2050704 2614423 8808534 2204398 140995 6180320 6166338	23-07-92 02-12-88 09-03-95 09-03-95 24-03-94 18-08-88 17-11-88 15-09-93 01-06-94 28-10-88 03-11-88 09-11-88 07-06-94	1
	*	JP-B- JP-T- AU-B- AU-A- AU-B- AU-A-	7046107 1503174 656966 1704992 656967 1705092	17-05-95 26-10-89 23-02-95 27-08-92 23-02-95 27-08-92	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members

Int. anal Application No PCT/DE 96/00821

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inv ionales Aktenzeichen PCT/DE 96/00821

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 G01N30/00 G01N33/558

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 GO1N

Recherchierte aber nieht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konzultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
х	US 4 425 438 A (D. BAUMANN) 10.Januar 1984 siehe Spalte 13, Zeile 59-68	1-3,8, 10-12, 14,15, 17,20
A	DE 27 20 073 A (RIEDEL-DE-HAAN) 9.November 1978 siehe Seite 3, Absatz 3 siehe Seite 4, Absatz 2 siehe Seite 7, Absatz 2-4 siehe Seite 8, Absatz 3-6 siehe Seite 8, Absatz 1	1-3,8, 12,17
A	DE 26 09 869 A (KURT DANNHÄUSER) 15.September 1977 siehe Seite 4 - Seite 6, Absatz 1 	1

X	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von F entnehmen	eld C z	u
* Beso	ndere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen	:	٠

X Siehe Anhang Patentfamilie

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedstum veröffentlicht worden ist
- 1.1. Veröffenthung, die gezigt ist, einen Prioritätsanspruch zweifdhaft erschienen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdamm einer anderen im Recherbenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden zoll oder die aus einem anderen in Grund angegeben ist (wie

mil oder die aus unem anneue.

"O Veröffentlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung,
der Bezumung, die Ausstellung oder andere Maßeidungen besieht
den Bezumung, die Ausstellung oder andere Maßeidungen besieht
den bezumpruchten Prioritistatium wröffentlichts werden ist.

"Veröffentlichung, die Mitglied dereiben Patentiamlie ist.

"Veröffentlichung, die Mitglied dereiben Patentiamlie ist.

"Abendedatum die internationalen Rechrechenherichts

Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindur kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden Veröffentlichung von besondere Bedeutung die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkent beruhend betraehtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Veräftentlichung für einen Fachtmann naheliegend ist

Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nieht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der

1 6, 10, 96

26.September 1996

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Bevollmächtigter Bediensteter

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

Zinngrebe, U

Formblett PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

Seite 1 von 2

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte onales Aktenzeichen
PCT/DE 96/00821

	mg) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	Detr. A normach Ma
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 202 423 A (DRAEGERWERK AG) 26. November 1986 siehe Spalte 3, Zeile 32 - Spalte 4, Zeile 40	1-3
A	EP 0 520 202 A (DRÄGERWERKE AG) 30.Dezember 1992 siehe Seite 2, Spalte 42 - Seite 4, Spalte 10	1
A	EP 0 560 411 A (UNILEVER NV) 15.September 1993 siehe Seite 8, Zeile 10-43	1
A	EP 0 648 532 A (ENGELHARD PROCESS CHEMICALS) 19.April 1995 siehe Seite 3, Zeile 47-49	1
	*	
		*
	1	

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int ionales Aktenzeichen
PCT/DE 96/00821

			101702	30,00022	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) de Patentfamilie	r	Datum der Veröffentlichung	
US-A-4425438	10-01-84	AU-A- 81 CA-A- 11 EP-A- 06 JP-C- 17 JP-B- 46	35482 84114 960700 778223	16-04-87 16-09-82 19-03-85 22-09-82 28-07-93 22-09-92 05-10-82	
DE-A-2720073	09-11-78	JP-A- 571 KEINE	161647	03-10-02	
DE-A-2609869	15-09-77	KEINE			
EP-A-202423	26-11-86		510497 235751	05-06-85 21-10-86	
EP-A-520202	30-12-92	DE-A- 4	121493	07-01-93	
EP-A-560411	15-09-93	AU-A- 1 AU-A- 8 AU-A- 8 DE-D- 3 DE-T- 3 DE-U- 8 EP-A- 0 ES-T- 2 FR-A- 2 FR-A- 2 HK-A- 6 JP-A- 6 JP-B- 7 JP-B- 7 AU-B- AU-B- 1 AU-B- 8	526207 522888 948994 949094 887771 885771 805565 291194 560410 650704 614423 808534 204398 140995 180320 160388 046107 503174 656966 704992 656967 705092	23-07-92 02-12-88 09-03-95 09-03-95 09-03-95 24-03-94 18-08-88 17-11-88 15-09-93 01-06-94 28-10-88 03-11-88 03-11-88 15-09-95 28-06-94 07-06-94 17-05-95 23-02-95 23-02-95 27-08-92	
1					

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

Angaben zu Veröffentlichungen, e				96/00821
Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	. Mitglied Patent	(er) der familie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-648532	19-04-95	DE-A- JP-A- US-A-	4424329 7185317 5484454	20-04-95 25-07-95 16-01-96

Matt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)